

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年6月24日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/053500 A1(51) 国際特許分類⁷:

G01N 33/92

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ 3階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2003/015633

(22) 国際出願日:

2003年12月5日 (05.12.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-355119 2002年12月6日 (06.12.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): デンカ生研株式会社 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0025 東京都 中央区 日本橋茅場町三丁目4番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤 康樹 (ITOH,Yasuki) [JP/JP]; 〒959-1695 新潟県 五泉市 南本町一丁目2番2号 デンカ生研株式会社内 Niigata (JP). 平野 勉 (HIRANO,Tsutomu) [JP/JP]; 〒142-8666 東京都 品川区 旗の台1-5-8 昭和大学医学部 第一内科内 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 2004/053500 A1

(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING SMALL-SIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIN

(54) 発明の名称: 小粒子低比重リポ蛋白の定量法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of quickly and conveniently fractionating and measuring a small-sized LDL. A method of quantifying a small-sized low density lipoprotein in a test sample which comprises the first step of separating the small-sized low density lipoprotein from other low density lipoproteins and the second step of measuring cholesterol, neutral fat or protein in the thus separated small-sized low density lipoprotein.

(57) 要約: 迅速かつ簡便な小粒子LDLの分別測定法の提供。被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白をそれ以外の低比重リポ蛋白と分離する第1工程と、分離した小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を測定する第2工程から成る、被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白の定量方法。

明 細 書

小粒子低比重リポ蛋白の定量法

技術分野

本発明は動脈硬化症の臨床診断に重要な小粒子低比重リポ蛋白の分別定量法に関する。

背景技術

低密度リポ蛋白 (LDL) は血液中におけるコレステロール運搬の主役であり、動脈硬化性疾患の危険因子であるが、LDL の中でも特に粒子サイズが小さく平均的な LDL より高比重な、小粒子低比重リポ蛋白（以下、「小粒子 LDL」という）は動脈硬化惹起性が通常の LDL より数倍高くなることが知られている。小粒子 LDL の増加は動脈硬化性疾患の主要な危険因子の 1 つであり、分別測定することは臨床上極めて重要である。

従来の小粒子 LDL 測定法は、超遠心法、電気泳動法、高速液体クロマトグラフィーを用いる方法などがある。超遠心法は比重の差を利用して小粒子 LDL を分離し、そのコレステロール量や蛋白量を定量する方法であり、小粒子 LDL は比重 1.040 ~ 1.063 に分画される (Atherosclerosis, 48 p. 33-49, 1993; Atherosclerosis, 106, p. 241-253, 1994 等)。しかしながら、この方法は高価な設備を必要とし、測定に非常に時間を要する。電気泳動法はポリアクリルアミドゲルを用いて LDL の移動度や粒子直径を測る方法で、小粒子 LDL は粒子サイズ 25.5nm 以下 (JAMA, 260, p. 1917-21, 1988 等) または、LDL の相対移動度 (VLDL から LDL までの移動距離を VLDL から HDL までの移動距離で除したもの) が 0.4 以上である (動脈硬化, 25, p. 67-70, 1997)。しかしながら、これらの方法は LDL の小粒子化の程度を測定する方法であって定量法ではない。また、一度に測定する検体数が限られており、測定に時間がかかる。最近、アガロース電気泳動において泳動後のゲルを脂質染色し、その染色パターンをコンピューター解析しリポ蛋白を定量する方法(特開 2000-356641 号公報)が発明されたが、これは酸化 LDL、

アセチル LDL、糖化 LDL、MDA-LDL などの変性 LDL を分析する方法であり、小粒子 LDL は正確に測定することができない。また解析に非常に高価な装置を必要とすることから一般的でない。

従来、HDL 測定において HDL 以外のリポ蛋白を凝集させ HDL を分離させるための分離剤として、ポリアニオンと 2 値の陽イオンを組み合わせて用いることが知られていた。例えば、デキストラン硫酸-Mg²⁺を用いる方法 (Clin. Chem., 28, p. 1379-88, 1982 等)、ヘパリン-Mn²⁺を用いる方法 (J Lipid Res., 19, p. 65-76, 1978 等)、ヘパリン-Ca²⁺を用いる方法 (Arch. Biochem. Biophys., 170, p. 334-40, 1975 等)、リンタングステン酸-Mg²⁺を用いる方法 (Clin. Chem., 23, p. 882-84, 1977 等) などがある。また、複数の分離剤を使用してリポ蛋白を段階的に沈殿させ、計算により LDL や VLDL の分画を測定する方法がすでに報告されている (特開平 7-294532 号公報、臨床病理 臨時増刊特集第 21 号, 82, 1975 等)。さらに、ポリエチレングリコールを用いて HDL を分離する方法も報告されている (Ann. Clin. Biochem. 18 p. 177-81 1981)。

さらに、従来、複数の分離剤を使用してリポ蛋白を段階的に沈殿させ、濁度の差により各リポ蛋白を測定する方法 (臨床病理 臨時増刊特集第 21 号, 82, 1975 等)、イオン強度の差により小粒子 LDL を混濁または溶解させ吸光度の差により小粒子 LDL を測定する方法 (特開 2003-28882 号公報) などがあった。しかし、吸光度を測定しているため、特異性や精度が不十分であった。

特許文献 1 特開 2000-356641 号公報

特許文献 2 特開平 7-294532 号公報

特許文献 3 特開 2003-28882 号公報

非特許文献 1 Atherosclerosis, 48, p. 33-49, 1993

非特許文献 2 Atherosclerosis, 106, p. 241-253, 1994

非特許文献 3 JAMA, 260, p. 1917-21, 1988

非特許文献 4 動脈硬化, 25, p. 67-70, 1997

非特許文献 5 Clin. Chem., 28, p. 1379-88, 1982

非特許文献 6 J Lipid Res., 19, p. 65-76, 1978

非特許文献 7 Arch. Biochem. Biophys., 170, p. 334-40, 1975

非特許文献 8 Clin. Chem., 23, p. 882-84, 1977

非特許文献 9 臨床病理 臨時増刊特集第 21 号, 82, 1975

非特許文献 10 Ann. Clin. Biochem. 18 p. 177-81 1981

発明の開示

本発明の目的は、迅速かつ簡便な小粒子 LDL の分別測定法を提供することである。

上記のように、ポリアニオン、2 倍の陽イオン等を分離剤として用いてリポ蛋白中の HDL 以外のリポ蛋白を凝集させるために用いることは報告されていた。しかし、リポ蛋白の代表的な分画である VLDL、LDL および HDL はそれぞれ物性が異なるので分離剤により分離することができるが、LDL を同様の方法で亜分画に分離することは試みられていなかった。

本発明者等は小粒子 LDL を分離する方法について鋭意検討を行い、被検体試料にポリアニオンおよび 2 倍の陽イオンを適当な濃度で作用させることにより、小粒子 LDL とそれ以外の LDL が分離されることを見いだした。さらに 1 倍の陽イオンを追加して作用させた場合に、1 倍の陽イオンはイオン強度調整剤として作用し、より良好な小粒子 LDL の分離を達成することができた。また、ポリアニオンと 2 倍の陽イオンおよび 1 倍の陽イオンの代わりに PEG を用いても同様の効果を得ることができた。

本発明者等は、ポリアニオンと 2 倍の陽イオンおよび 1 倍の陽イオンを組み合させた場合、または PEG を用いた場合のそれぞれの濃度について詳細な検討を行い、これら濃度範囲を規定することで、LDL 粒子の中でも小粒子 LDL 以外の LDL を凝集させ小粒子 LDL を分離する条件を見いだした。この反応により小粒子 LDL 以外の LDL は凝集物を形成し、遠心分離やフィルター処理により反応液中から取り除くことができる。さらに分離後の反応液に LDL コレステロール測定用試薬または LDL 中中性脂肪測定用試薬または抗ヒトアポ蛋白 B 抗体を作用させることにより、小粒子 LDL 中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を定量することが可能となり、本発明を完成するに至った。

上述のイオン強度の差により小粒子 LDL を混濁または溶解させ吸光度の差によ

り小粒子 LDL を測定する方法（特開 2003-28882 号公報）と比べて、本発明では分離後的小粒子 LDL をコレステロール、中性脂肪、蛋白質の形で測定するため特異性や精度において優れている。

すなわち、本発明は以下の方法およびキットを提供する。

- (1) 被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白をそれ以外の低比重リポ蛋白と分離する第 1 工程と、分離した小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロール、中性脂肪または蛋白質を測定する第 2 工程から成る、被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白の定量方法、
- (2) 前記第 1 工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離にポリアニオンおよび 2 値の陽イオンを用いることを特徴とする (1) の方法、
- (3) 前記第 1 工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離に、さらに 1 値の陽イオンを用いることを特徴とする (1) または (2) の方法、
- (4) 前記第 1 工程で使用されるポリアニオンがヘパリン、リンタングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする (2) または (3) の方法、
- (5) 前記第 1 工程で使用される 2 値の陽イオンが Mn^{2+} 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} からなる群から選択される 2 値の陽イオンであることを特徴とする (2) から (4) のいずれかの方法、
- (6) 前記第 1 工程で使用される 1 値の陽イオンが Na^+ 、 K^+ および Li^+ からなる群から選択される 1 値の陽イオンであることを特徴とする (3) または (5) の方法、
- (7) 被検体試料にポリアニオンを添加したときのポリアニオンの最終濃度が、ヘパリンの場合 10～250U/mL、デキストラン硫酸の場合 0.02～1.25%、リンタングステン酸の場合 0.02～1.25% である (4) から (6) のいずれかの方法、
- (8) 被検体試料に 2 値の陽イオンを添加したときの 2 値の陽イオンの最終濃度が、 Mn^{2+} の場合 2.5～35mmol/L、 Mg^{2+} の場合 2.5～125mmol/L、 Ca^{2+} の場合 1～75mmol/L である (5) から (7) のいずれかの方法、

(9) 被検体試料に1価の陽イオンを添加したときの1価の陽イオンの最終濃度が、0~50mmol/Lである(6)から(8)のいずれかの方法、

(10) 前記第1工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離にPEGを用いることを特徴とする(1)の方法、

(11) 被検体試料にPEGを添加したときのPEGの最終濃度が、2~5%である(10)の方法、

(12) 前記第2工程のコレステロール測定が、分画操作を要しない低比重リポ蛋白中コレステロールの定量試薬を用いることを特徴とする(1)から(11)のいずれかの方法、

(13) 前記第2工程の中性脂肪測定が、分画操作を要しない低比重リポ蛋白中中性脂肪定量試薬を用いることを特徴とする(1)から(11)のいずれかの方法、

(14) 前記第2工程の蛋白測定が、抗ヒトアポ蛋白B抗体を用いることを特徴とする(1)から(11)のいずれかの方法、

(15) 被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオンを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、被検体試料から小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(16) 被検体試料に、さらに1価の陽イオンを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、(15)の方法、

(17) ポリアニオンがヘパリン、リンタングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする(15)または(16)の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(18) 2価の陽イオンがMn²⁺、Mg²⁺およびCa²⁺からなる群から選択される2価の陽イオンであることを特徴とする(15)から(17)のいずれかの小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(19) 1価の陽イオンがNa⁺、K⁺およびLi⁺からなる群から選択される1価の陽イオンであることを特徴とする(15)から(18)のいずれかに記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(20) 被検体試料にポリアニオンを添加したときのポリアニオンの最終濃度が、

ヘパリンの場合 10~250U/mL、デキストラン硫酸の場合 0.02~1.25%、リンタングステン酸の場合 0.02~1.25%である (17) から (19) のいずれかの小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(21) 被検体試料に2価の陽イオンを添加したときの2価の陽イオンの最終濃度が、は Mn^{2+} の場合 2.5~35mmol/L、 Mg^{2+} の場合 2.5~125mmol/L、 Ca^{2+} の場合 1~75mmol/L である (18) から (20) のいずれかの小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(22) 被検体試料に1価の陽イオンを添加したときの1価の陽イオンの最終濃度が、0~50mmol/L である (19) から (21) のいずれかの小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(23) 被検体試料にPEGを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、被検体試料から小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(24) 被検体試料にPEGを添加したときのPEGの最終濃度が2~5%である (23) の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法、

(25) ポリアニオンおよび2価の陽イオンを含む分離剤および低比重リポ蛋白測定試薬を含む、小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を測定することによる小粒子低比重リポ蛋白測定用キット、

(26) 分離剤が、さらに1価の陽イオンを含む (25) の小粒子低比重リポ蛋白測定用キット、

(27) PEGを含む分離剤および低比重リポ蛋白測定試薬を含む、小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を測定することによる小粒子低比重リポ蛋白測定用キット、

(28) ポリアニオンがヘパリン、リンタングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする (25) または (16) のキット、

(29) 2価の陽イオンが Mn^{2+} 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} からなる群から選択される2価の陽イオンであり、1価の陽イオンが Na^+ 、 K^+ および Li^+ からなる群から選択される1価の陽イオンであることを特徴とする (26) または (28) のキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-355119 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の第 1 工程の方法を示す図である。

図 2 は、実施例 1 における本発明の第一工程の効果を示す図である。

図 3 は、実施例 2 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図 4 は、実施例 3 における本発明法による小粒子 LDL 中アポ B の測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中アポ B の測定値との相関性を示す図である。

図 5 は、実施例 4 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図 6 は、実施例 5 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図 7 は、実施例 6 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図 8 は、実施例 7 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図 9 は、実施例 8 における本発明法による小粒子 LDL 中中性脂肪の測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中中性脂肪の測定値との相関性を示す図である。

図 10 は、実施例 9 における本発明法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値と、超遠心法による小粒子 LDL 中コレステロールの測定値との相関性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法は、第1工程および第2工程からなる。第1工程では被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオンからなる分離液、ポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンからなる分離液またはPEGを添加し、一定時間反応後VLDLおよび小粒子LDL以外のLDLを凝集させ、遠心分離やフィルターにより除去する。続く第2工程では小粒子LDL中のコレステロールや中性脂肪や蛋白質を定量する。第1工程では上記リポ蛋白除去後の溶液中に小粒子LDLの他HDLが残るが、LDLコレステロール測定試薬またはLDL中の中性脂肪測定試薬または抗ヒトアポB抗体を作用させることにより、小粒子LDLの成分のみを分別測定することができる。

上述のように、リポタンパク質は大きくVLDL、LDLおよびHDLの分画に分けられ、LDLはさらに小粒子LDLとそれ以外の亜分画に分けられる。小粒子LDLをSLDL(small LDL)、Small dense LDL、dense LDLと呼ぶこともあり、またそれ以外のLDLをLLDL(large LDL)、Light LDLと呼ぶこともある。これらの分画および亜分画は、粒子サイズまたは比重により区別できる。その粒子サイズの直径は、報告者により異なるがVLDLが30nm～80nm(30nm～75nm)で、LDLが22nm～28nm(19nm～30nm)、HDLが直径7～10nmである。比重は、VLDLが1.006以下、LDLが1.019～1.063、HDLが1.063～1.21である。LDL粒子直径はグラジエントゲル電気泳動(GGE)(JAMA, 260, p. 1917-21, 1988)、NMR(HANDBOOK OF LIPOPROTEIN TESTING 2nd Edition, Nader Rifai他編, p. 609-623, AACC PRESS: The Fats of Life Summer 2002, LVDD 15 YEAR ANNIVERSARY ISSUE, Volume AVI No. 3, p. 15-16)により測定でき、比重は超遠心分離による分析(Atherosclerosis, 106, p. 241-253, 1994; Atherosclerosis, 83, p. 59, 1990)に基づいて決定できる。

本発明の方法で測定しようとする小粒子LDLは、一般的にはLDL画分のうち直径が約22.0～約25.5nmの亜分画、比重1.040～1.063の亜分画を指す。LDLを大きさにより亜分画に分けているのは、LDLのうち粒子径が小さいものが動脈硬化惹起性が高く、LDLの中でもより悪性度が高いので、LDLの中でも小さいものを分別測定する必要があったからである。LDL内で直径分布や比重分布は連続してお

り、比重がどの程度以上のものが特に悪性度が高いというように明確に区別できるものではない。従って、上記の比重 1.040～1.063 という値も小粒子 LDL の特性として確立したものではなく、広く用いられており確立した値といえる LDL の比重範囲 1.019～1.063 を中央点で分けたものである。例えば、別の報告では 1.044～1.060 に分画される (Atherosclerosis:106 241-253 1994)。小粒子 LDL の比重をどの範囲にするかは、報告者により若干の違いがあるが、いずれもその範囲で分別した場合の小粒子 LDL の存在が臨床的な悪性度と関連している。

本発明において、小粒子 LDL という場合、LDL のうち比重が小さいものであって、臨床的に動脈硬化惹起性がそれ以外の LDL よりも大きいもの、好ましくは LDL の比重範囲のうち中央点より上の比重範囲に属するもの、さらに好ましくは比重 1.040～1.063 の範囲に属する LDL をいう。

本発明の方法で用いる被検体試料は、血清または血漿、好ましくは血清である。第 1 工程において、適当な体積の被検体試料にポリアニオンおよび 2 値の陽イオン、またはポリアニオン、2 値の陽イオンおよび 1 値の陽イオンをポリアニオン、2 値の陽イオンおよび 1 値の陽イオンの最終濃度が特定の範囲内になるように添加する。小粒子 LDL とそれ以外の LDL の分離はポリアニオンと 2 値の陽イオンの存在下で行うことができるが、さらに 1 値の陽イオンを存在させることにより 1 値の陽イオンがイオン強度調整剤として作用し、より良好な小粒子 LDL および HDL を含む画分の分離を達成することができる。この際、特定の濃度のポリアニオンおよび 2 値の陽イオンからなる分離液、または特定の濃度のポリアニオン、2 値の陽イオンおよび 1 値の陽イオンからなる分離液をあらかじめ調製しておいて、これを添加してもよいし、特定の濃度のポリアニオンおよび 2 値の陽イオンおよび 1 値の陽イオンを別々に調整しておいて、それぞれを別々に添加してもよい。別々に添加する場合の被検体試料への添加順序は限定されない。ポリアニオンおよび 2 値の陽イオンからなる分離剤、またはポリアニオン、2 値の陽イオンおよび 1 値の陽イオンからなる分離液を用いる場合、分離液の溶媒として、精製水、生理食塩水および各種緩衝液を用いることができる。分離液の pH は 3～8 が好ましい。

第 1 工程で用いるポリアニオンとしてはヘパリン、リンタングステン酸、デキ

ストラン硫酸などを好適に用いることができる。被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオン、またはポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンを添加した後のポリアニオンの最終濃度は濃度はヘパリンの場合 10～250U/mL、リンタングステン酸の場合 0.02～1.25%、デキストラン硫酸の場合 0.02～1.25% が好ましい。

第1工程で用いる2価金属イオンには Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} を用いることができ、好適には Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} が用いられる。被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオンを添加した後の2価の陽イオンの最終濃度は、ポリアニオンとしてヘパリンを用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 7.5～35mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 40～125mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 50～75mmol/L が好ましく、リンタングステン酸を用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 2.5～7.5mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 2.5～50mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 1～30mmol/L が好ましい。デキストラン硫酸を用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 2.5～10mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 7.5～30mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 5～20mmol/L が好ましい。

また、さらに第1工程で1価の陽イオンを用いる場合、1価金属イオンには Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ を好適に用いることができる。1価の陽イオンの最終濃度は、0～50mmol/L が望ましい。

例えば、被検体試料 100 μ L にポリアニオンと2価の陽イオンを含む分離剤、またはポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンを含む分離剤 100 μ L を添加する。この際の、分離剤中のポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンの濃度は被検体試料と分離剤を混合したときのポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンの濃度が上記最終濃度になるように調製しておけばよい。分離剤中のポリアニオンの濃度は、ヘパリンの場合 20～500U/mL、リンタングステン酸の場合 0.04～2.5%、デキストラン硫酸の場合 0.04～2.5% が好ましい。また、分離剤中の2価陽イオンの濃度は、ポリアニオンとしてヘパリンを用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 15～70mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 80～250mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 100～150mmol/L が好ましく、リンタングステン酸を用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 5～15mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 5～100mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 2～60mmol/L が好ましい。デキストラン硫酸を用いた場合の Mn^{2+} 濃度は 5～20mmol/L、 Mg^{2+} 濃度は 15～60mmol/L、 Ca^{2+} 濃度は 10～40mmol/L が好ましい。1価の陽イオンの濃度は 0～100mmol/L が

好ましい。

被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオン、またはポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンを添加した後、反応混液を攪拌し、第1工程の反応を行わせる。

第1工程での反応は2°C～45°Cの温度で行うことが好ましく、20°C～37°Cで行うことがさらに好ましい。

第1工程での反応は1分～30分間の時間で行うことが好ましく、5分～15分間の時間で行うことがさらに好ましい。

なお、第1工程において被検体試料に添加するポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンの至適濃度はポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンの種類の組み合わせによっても変わり、また被検体試料のpH、イオン強度等の条件によっても変わってくる。従って、本発明の第1工程の反応を行う場合、常に同じ比重範囲のものが得られるとは限らず、特に上述の一般的に小粒子LDLの比重範囲とされている1.040～1.063のものが得られるとは限らない。但し、上記濃度条件で第1工程の反応を行えば、ほぼ同等の比重を有するLDLが得られ、そのLDLは上記定義のLDLに含まれる。さらに、小粒子LDLの比重を1.040～1.063に固定して考えた場合であって、本発明の第1工程により得られるLDLの比重がこの範囲から若干ずれたとしても、そのずれは大きくなない。またLDL全体における比較的小粒子のLDLを含んでいることには変わりはないので、本発明の第1工程により得られる小粒子LDLの量は、ある被検体の動脈硬化を罹患するリスクを反映している。

第1工程の小粒子LDLおよびHDLを含む画分の分離は、ポリアニオンおよび2価の陽イオン、またはポリアニオン、2価の陽イオンおよび1価の陽イオンの代わりにポリエチレングリコール(PEG)を被検体試料に添加することによっても行うことができる。この際に用いられるPEGの分子量は、4,000～20,000が望ましく、PEGの最終濃度は4～10%が望ましい。

第1工程の反応が終了した後、遠心分離を行い上清を得ることにより、小粒子LDLおよびHDLを含む画分を採取することができる。この際の遠心分離条件は、9,000g～36,000gで1～30分である。

また、第1工程の反応が終了した後、反応混液をフィルターにかけてもパススルーとして小粒子 LDL および HDL を含む画分を採取することができる。フィルターは圧力を加えてろ過するタイプのものであっても、遠心操作によりろ過するタイプのものであってもよい。この際用いるフィルターの分画サイズは、0.10～0.80 μm であり、例えば、市販のマイレクス、ウルトラフリー (MILLIPORE 社製)、ミニザルト (Sartorius 社製)、DISMIC (ADVANTEC 社製)、HTタフリン・アクロディスク・シリンジフィルター (PALL Gelman Laboratory 社製) 等を用いることができる。

第1工程で得られた小粒子 LDL および HDL を含む画分中の LDL のみを測定することにより、被検体試料中の小粒子 LDL を定量することができる。

この際、LDL の測定は、LDL 中のコレステロールを測定するか、LDL 中の中性脂肪を測定するか、LDL 中のアポ B タンパク質を測定することにより行える。

第2工程で用いられる分画操作を要しない LDL コレステロール測定方法としていくつかの方法 (特開平 11-318496 号公報、特開 2002-202314 号公報、特開平 10-080300 号公報、特開平 09-313200 号公報、特開平 11-155595 号公報、特許第 3256241 号公報) 等があるが、これらを好適に用いることができる。

例えば、特開平 11-318496 号公報の記載に従って、以下のようにして第1工程で得られた小粒子 LDL および HDL を含む画分中の LDL を定量することができる。第1工程で得られた小粒子 LDL および HDL を含む画分を試料とし、LDL 以外のリポタンパク質に作用する界面活性剤の存在下でコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を消去することにより、試料中の LDL 以外のリポタンパク質を消去し (ステップA)、次いで試料中の残存 LDL を定量することができる (ステップB)。この際、LDL 以外のリポタンパク質に作用する界面活性剤としては、HLB 値が 13 以上 15 以下のポリアルキレンオキサイド誘導体が挙げられ、具体例としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等で HLB 値が 13 以上 15 以下の化合物がある。ステップAで用いられる上記界面活性剤の濃度

は、0.1～10g/L程度が好ましく、さらに好ましくは0.5～5.0g/L程度である。過酸化水素を消去する方法としては、カタラーゼを作用させて水と酸素に分解する方法、及びペルオキシダーゼを用いてフェノール系又はアニリン系水素供与体化合物と過酸化水素を反応させて無色キノンに転化する方法を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。ステップAの反応液中のコレステロールエステラーゼ濃度は0.2～1.0U/mL程度が好ましく、由来としてはシュードモナス属細菌から生成されるものが効果的である。また、コレステロールオキシダーゼの濃度は0.1～0.7U/mL程度が好ましく、細菌や酵母由来のものを用いることが好ましい。さらに、カタラーゼの濃度は40～100U/mL程度が好ましい。また、過酸化水素を無色キノンへ転化する場合のペルオキシダーゼの濃度は0.4～1.0U/mLが好ましく、フェノール系又はアニリン系水素供与体化合物の濃度としては0.4～0.8mmol/Lが好ましい。ステップBでは、被検試料中の残存コレステロールを定量する。これは、例えば、少なくともLDLに作用する界面活性剤を加え、第1工程で加えたコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することにより行なうことができる。この際LDLに作用する界面活性剤としてHLB値が11以上13未満のポリアルキレンオキサイド誘導体が挙げられ、具体例としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等でHLB値が11以上13未満の化合物が挙げられる。ステップBのその他の好ましい反応条件は、第1工程における好ましい反応条件と同様である。

LDLを測定するための測定キットが市販されており、これらの市販の測定キットを利用して、LDLを測定してもよい。市販のキットとしては、例えばLDL-EX (N) (デンカ生研)がある。

第2工程で用いられる分画操作を要しないLDL中の中性脂肪測定方法としていくつかの方法(WO00/43537号公報)等があるが、これらを好適に用いることができる。

第2工程で用いられる抗ヒトアポB抗体を作用させる方法としていくつかの方

法（特許第 2638137 号公報、特開平 02-64458 号公報）等があるが、これらを好適に用いることができる。

本発明には、小粒子 LDL を含む画分を分離するための第 1 工程を行うための試薬および分離した小粒子 LDL を測定するための試薬を含むキットも含まれる。該キットは、例えば、上述の LDL 測定試薬キットならびにポリアニオンおよび 2 倍の陽イオン（またはポリアニオンと 2 倍の陽イオンを含む分離剤）等を含む。該キットはさらに遠心分離用チューブ、小粒子 LDL 分離用フィルターを含んでいてもよい。また、該キットは、ポリアニオンおよび 2 倍の陽イオンに加えて 1 倍の陽イオンを含んでいてもよく、この場合ポリアニオン、2 倍の陽イオンおよび 1 倍の陽イオンを含む分離剤としてこれらの物質を含んでいてもよい。さらに、該キットは、ポリアニオンおよび 2 倍の陽イオンの代わりにポリエチレングリコールを含んでいてもよい。

以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕

電気泳動法により小粒子 LDL を多く含むことが確認される検体及びそれ以外の LDL を多く含む検体を用いて第一工程の効果を求めた。血清 50 μ L に 60U/mL ヘパリンナトリウム及び 40mmol/L MnCl₂ からなる分離液 50 μ L を添加し、25°C で 15 分間反応させた。その後 18,500g で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収し、市販のディスク型ポリアクリルアミドゲルリポフォーを用いて反応性を比較した。分離液と反応前の血清は等量の生理食塩水にて希釈した後泳動した。図 1 に本発明の第 1 工程の方法を示す図を、図 2 に結果を示す。図 2 は正常な LDL のみが選択的に取り除かれていることを示している。図 2 中、レーン No. 1 は小粒子 LDL 以外の LDL を多く含む検体の反応前の泳動結果を、レーン No. 2 は小粒子 LDL を多く含む検体の反応前の泳動結果を、レーン No. 3 は小粒子 LDL 以外の LDL を多く含む検体の反応後の泳動結果を、レーン No. 4 は小粒子 LDL を多く含む検体の反応後の泳動結果を示す。

〔実施例 2〕

血清を試料とし、本発明法により小粒子 LDL を測定し、その測定値を超遠心法

によって得られる値と比較した。この結果を図 3 に示す。

すなわち、検体 $100\mu\text{L}$ に 300U/mL ヘパリンナトリウム及び 150mmol/L MgCl_2 からなる分離液 $100\mu\text{L}$ を添加し、 37°C で 10 分間反応させた。その後 $18,500\text{g}$ で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収し、市販されているキット LDL-EX (N) (デンカ生研社製) を使用して日立 7170 型自動分析装置によって小粒子 LDL 中のコレステロールを測定した。超遠心法は血清と比重液を混合後、遠心を行い比重 $1.040\sim1.063$ の分画を回収し、コレステロールを測定して小粒子 LDL 中コレステロール値とした。図 3 に示すように本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

[実施例 3]

血清からなる検体 $100\mu\text{L}$ に平均分子量 5000 の 1.5% デキストラン硫酸ナトリウム及び 40mmol/L MgCl_2 からなる分離液 $100\mu\text{L}$ を添加し、 25°C で 10 分間反応させた。その後 $18,500\text{g}$ で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収し、抗ヒトアポ B 抗体を用いた免疫比濁法 (第一化学薬品 アポ B オート・N「第一」を使用) によって小粒子 LDL 中のアポ B 量を測定した。超遠心法は血清と比重液を混合後、遠心を行い比重 $1.040\sim1.063$ の分画を回収し、アポ B を測定して小粒子 LDL 中アポ B 値とした。その結果を図 4 に示す。図 4 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

[実施例 4]

実施例 2 において、分離液を 0.3% リンタンクス滕酸ナトリウム及び 7.5mmol/L CaCl_2 とする以外は同様の試薬を用いて同様の操作を行い、本発明法による測定値と超遠心法によって得られる値と比較した。その結果を図 5 に示す。図 5 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

[実施例 5]

実施例 2 において、分離液を 40U/mL ヘパリンナトリウム及び 30mmol/L MnCl_2 とする以外は同様の試薬を用いて同様の操作を行い、本発明法による測定値と超遠心法によって得られる値と比較した。その結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性

を示した。

〔実施例 6〕

実施例 2において、分離液を 500U/mL ヘパリンナトリウム及び 140mmol/L MgCl₂ 及び 34mmol/L KCl とする以外は同様の試薬を用いて同様の操作を行い、本発明法による測定値と超遠心法によって得られる値と比較した。その結果を図 7 に示す。図 7 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

〔実施例 7〕

実施例 2において、分離液を 8% PEG (分子量 6,000) とする以外は同様の試薬を用いて同様の操作を行い、本発明法による測定値と超遠心法によって得られる値と比較した。その結果を図 8 に示す。図 8 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

〔実施例 8〕

血清からなる検体 100 μL に 150U/mL ヘパリン Na 及び 90mmol/L MgCl₂ からなる分離液 100 μL を添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後 18,500g で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収し、LDL 中中性脂肪測定試薬によって小粒子 LDL 中の中性脂肪を測定した。超遠心法は血清と比重液を混合後、遠心を行い比重 1.040 ~ 1.063 の分画を回収し、中性脂肪を測定して小粒子 LDL 中中性脂肪値とした。その結果を図 9 に示す。図 9 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

〔実施例 9〕

血清からなる検体 100 μL に 150U/mL ヘパリン Na 及び 90mmol/L MgCl₂ からなる分離液 100 μL を添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後遠心タイプのフィルタ一濾過 (MILLIPORE 社の Ultrafree-MC (0.1 μm Filter Unit) を使用) を用いて 10,000g で 1 分間遠心分離を行い、ろ液を回収後、小粒子 LDL 中のコレステロールを測定し超遠心法によって得られる値と比較した。その結果を図 10 に示す。図 10 に示すように、実施例 2 と同様に本発明法による結果は超遠心法による結果と良好な相関性を示した。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明によれば簡便な操作で小粒子 LDL をそれ以外の LDL と分離することができ、小粒子 LDL 中のコレステロールまたは中性脂肪またはアポBを分別測定することができるため臨床上極めて有用である。

請求の範囲

1. 被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白をそれ以外の低比重リポ蛋白と分離する第1工程と、分離した小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロール、中性脂肪または蛋白質を測定する第2工程から成る、被検試料中の小粒子低比重リポ蛋白の定量方法。

2. 前記第1工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離にポリアニオンおよび2価の陽イオンを用いることを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 前記第1工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離に、さらに1価の陽イオンを用いることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

4. 前記第1工程で使用されるポリアニオンがヘパリン、リントングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする請求項2または3に記載の方法。

5. 前記第1工程で使用される2価の陽イオンが Mn^{2+} 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} からなる群から選択される2価の陽イオンであることを特徴とする請求項2から4のいずれか1項に記載の方法。

6. 前記第1工程で使用される1価の陽イオンが Na^+ 、 K^+ および Li^+ からなる群から選択される1価の陽イオンであることを特徴とする請求項3から5のいずれか1項に記載の方法。

7. 被検体試料にポリアニオンを添加したときのポリアニオンの最終濃度が、ヘパリンの場合 10～250U/mL、デキストラン硫酸の場合 0.02～1.25%、リントングステン酸の場合 0.02～1.25%である請求項4から6のいずれか1項に記載の方法。

8. 被検体試料に2価の陽イオンを添加したときの2価の陽イオンの最終濃度が、 Mn^{2+} の場合 2.5～35mmol/L、 Mg^{2+} の場合 2.5～125mmol/L、 Ca^{2+} の場合 1～75mmol/Lである請求項5から7のいずれか1項に記載の方法。

9. 被検体試料に1価の陽イオンを添加したときの1価の陽イオンの最終濃度が、0～50mmol/Lである請求項6から8のいずれか1項に記載の方法。

10. 前記第1工程において小粒子低比重リポ蛋白とそれ以外の低比重リポ蛋白の分離にPEGを用いることを特徴とする請求項1記載の方法。

11. 被検体試料にPEGを添加したときのPEGの最終濃度が、2～5%である請求項10記載の方法。

12. 前記第2工程のコレステロール測定が、分画操作を要しない低比重リポ蛋白中コレステロールの定量試薬を用いることを特徴とする請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。

13. 前記第2工程の中性脂肪測定が、分画操作を要しない低比重リポ蛋白中中性脂肪の定量試薬を用いることを特徴とする請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。

14. 前記第2工程の蛋白測定が、抗ヒトアポ蛋白B抗体を用いることを特徴とする請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。

15. 被検体試料にポリアニオンおよび2価の陽イオンを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、被検体試料から小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

16. 被検体試料に、さらに1価の陽イオンを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、請求項15記載の方法。

17. ポリアニオンがヘパリン、リンタングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする請求項15または16に記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

18. 2価の陽イオンがMn²⁺、Mg²⁺およびCa²⁺からなる群から選択される2価の陽イオンであることを特徴とする請求項15から17のいずれか1項に記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

19. 1価の陽イオンがNa⁺、K⁺およびLi⁺からなる群から選択される1価の陽イオンであることを特徴とする請求項15から18のいずれか1項に記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

20. 被検体試料にポリアニオンを添加したときのポリアニオンの最終濃度が、ヘパリンの場合10～250U/mL、デキストラン硫酸の場合0.02～1.25%、リンタングステン酸の場合0.02～1.25%である請求項17から19のいずれか1項に記

載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

21. 被検体試料に2価の陽イオンを添加したときの2価の陽イオンの最終濃度が、 Mn^{2+} の場合 2.5～35mmol/L、 Mg^{2+} の場合 2.5～125mmol/L、 Ca^{2+} の場合 1～75mmol/L である請求項18から20のいずれか1項に記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

22. 被検体試料に1価の陽イオンを添加したときの1価の陽イオンの最終濃度が、0～50mmol/L である請求項19から21のいずれか1項に記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

23. 被検体試料にPEGを添加し、小粒子低比重リポ蛋白以外の低比重リポ蛋白を沈殿させることを含む、被検体試料から小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

24. 被検体試料にPEGを添加したときのPEGの最終濃度が2～5%である請求項23記載の小粒子低比重リポ蛋白を分離する方法。

25. ポリアニオンおよび2価の陽イオンを含む分離剤および低比重リポ蛋白測定試薬を含む、小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を測定することによる小粒子低比重リポ蛋白測定用キット。

26. 分離剤が、さらに1価の陽イオンを含む請求項25記載の小粒子低比重リポ蛋白測定用キット。

27. PEGを含む分離剤および低比重リポ蛋白測定試薬を含む、小粒子低比重リポ蛋白中のコレステロールまたは中性脂肪または蛋白質を測定することによる小粒子低比重リポ蛋白測定用キット。

28. ポリアニオンがヘパリン、リンタングステン酸およびデキストラン硫酸からなる群から選択されるポリアニオンであることを特徴とする請求項25または26記載のキット。

29. 2価の陽イオンが Mn^{2+} 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} からなる群から選択される2価の陽イオンであり、1価の陽イオンが Na^+ 、 K^+ および Li^+ からなる群から選択される1価の陽イオンであることを特徴とする請求項26または28に記載のキット。

図 1

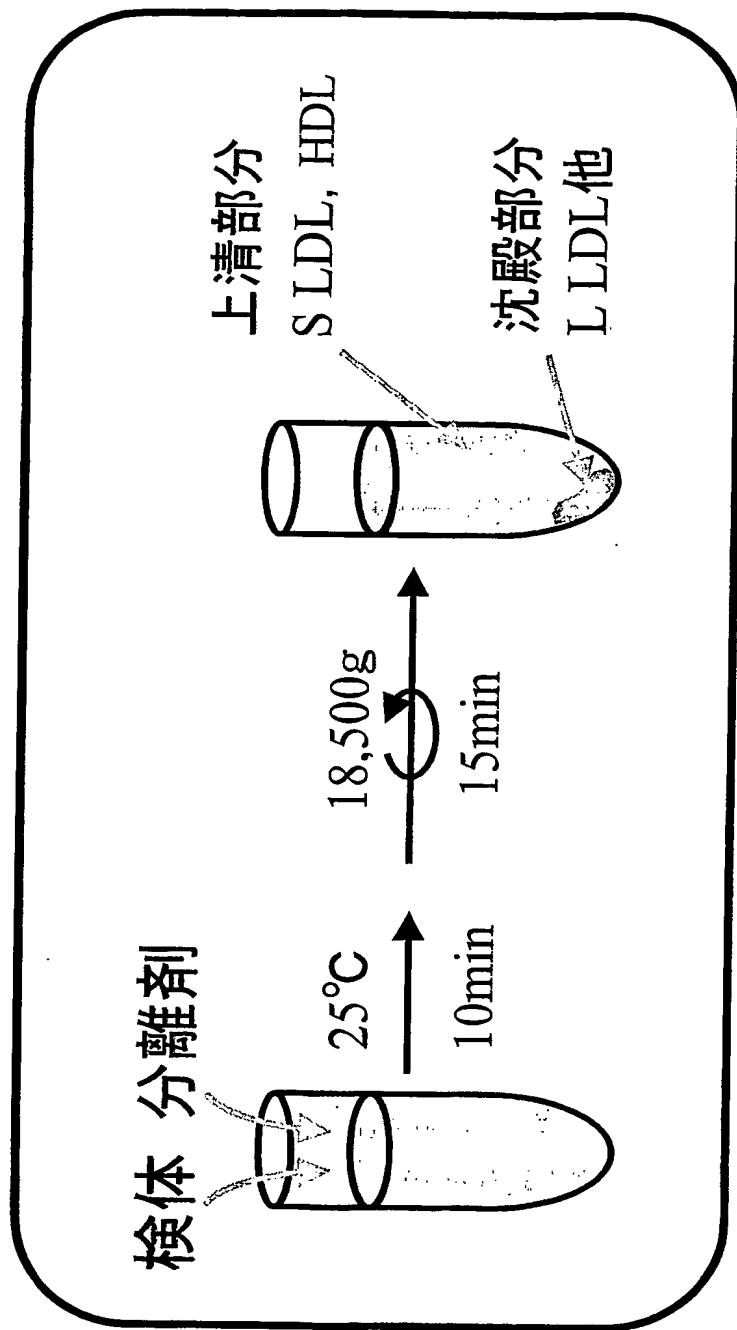


図 2

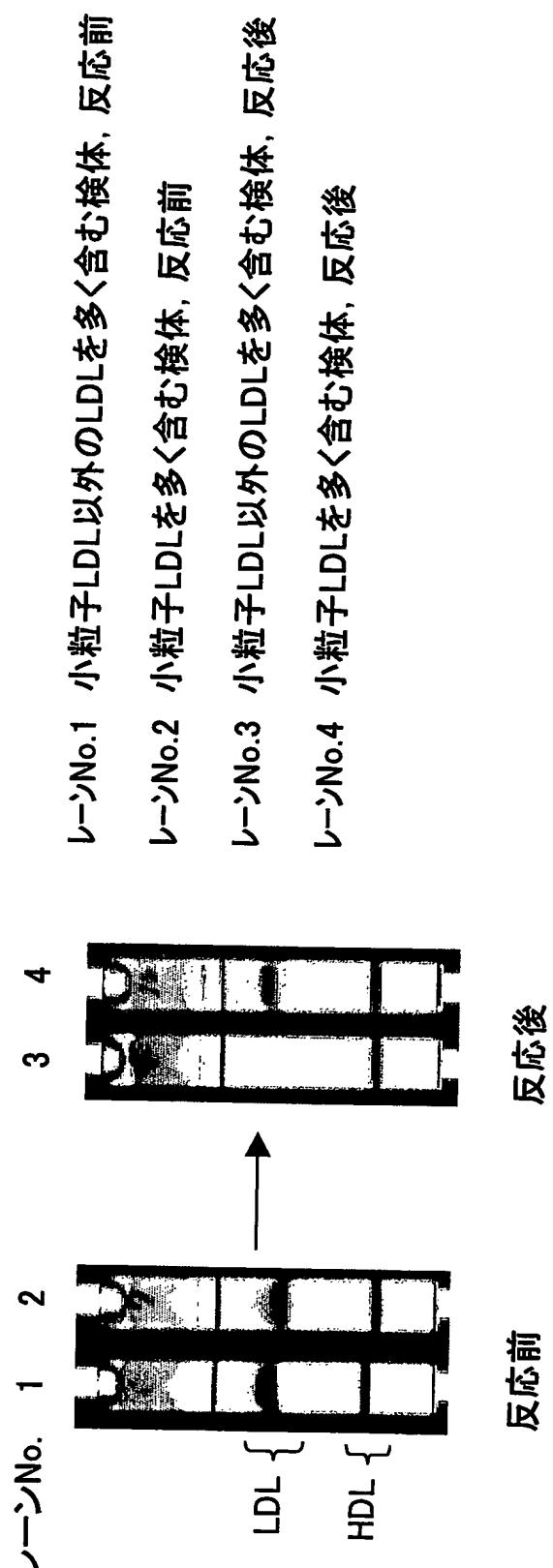


図 3

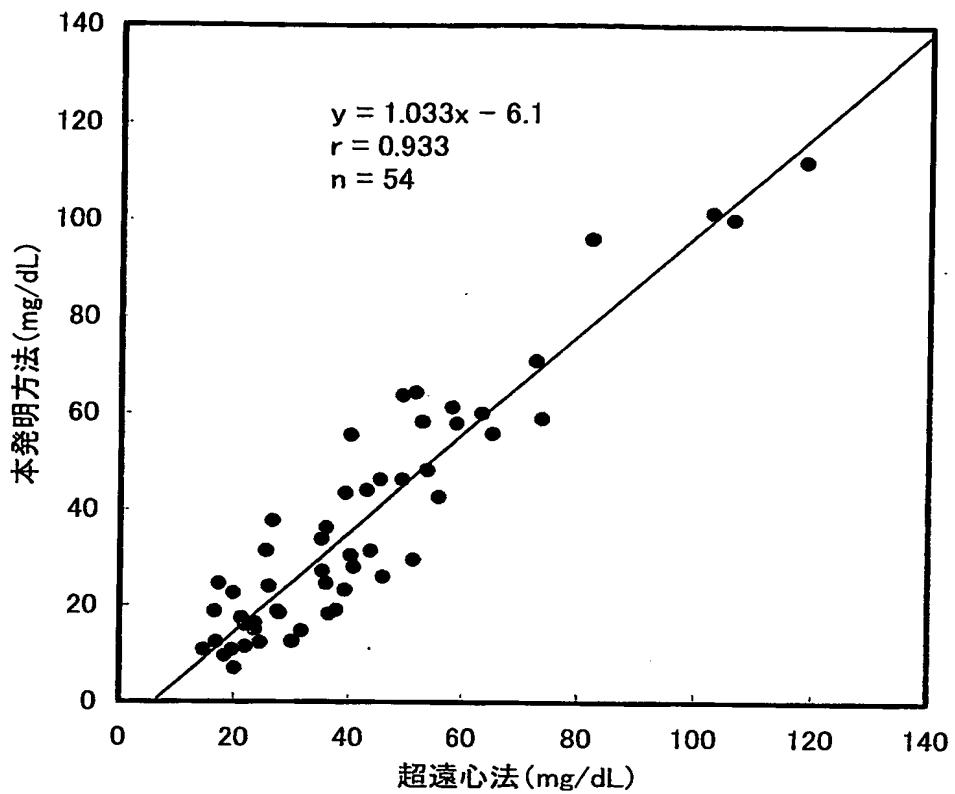


図 4

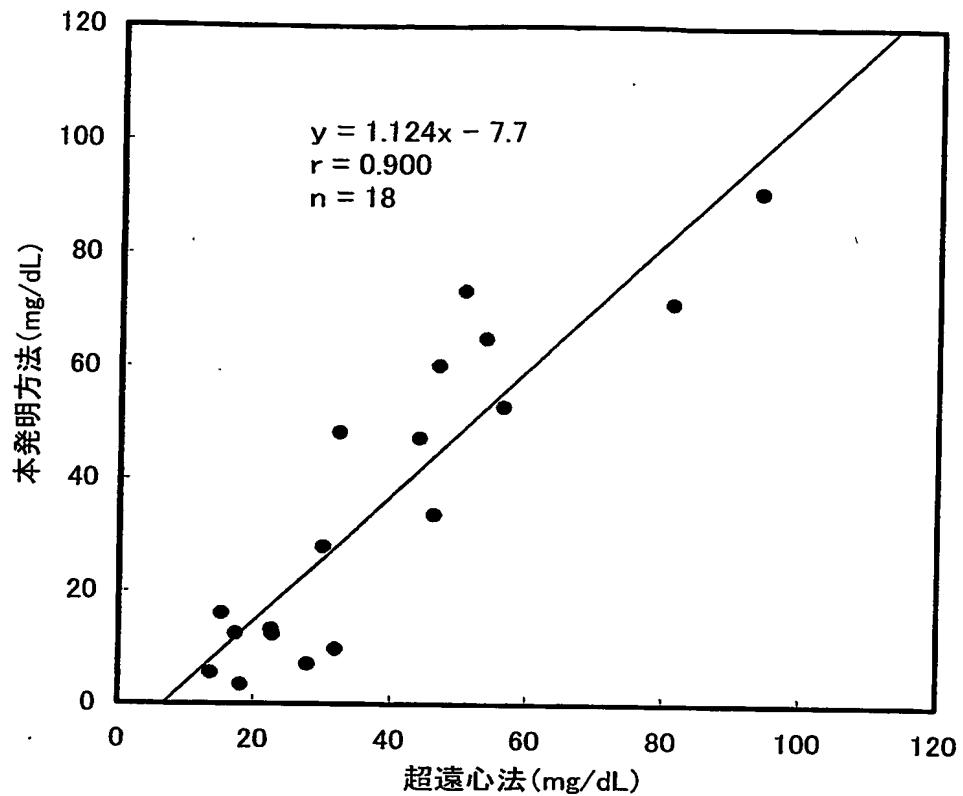


図 5

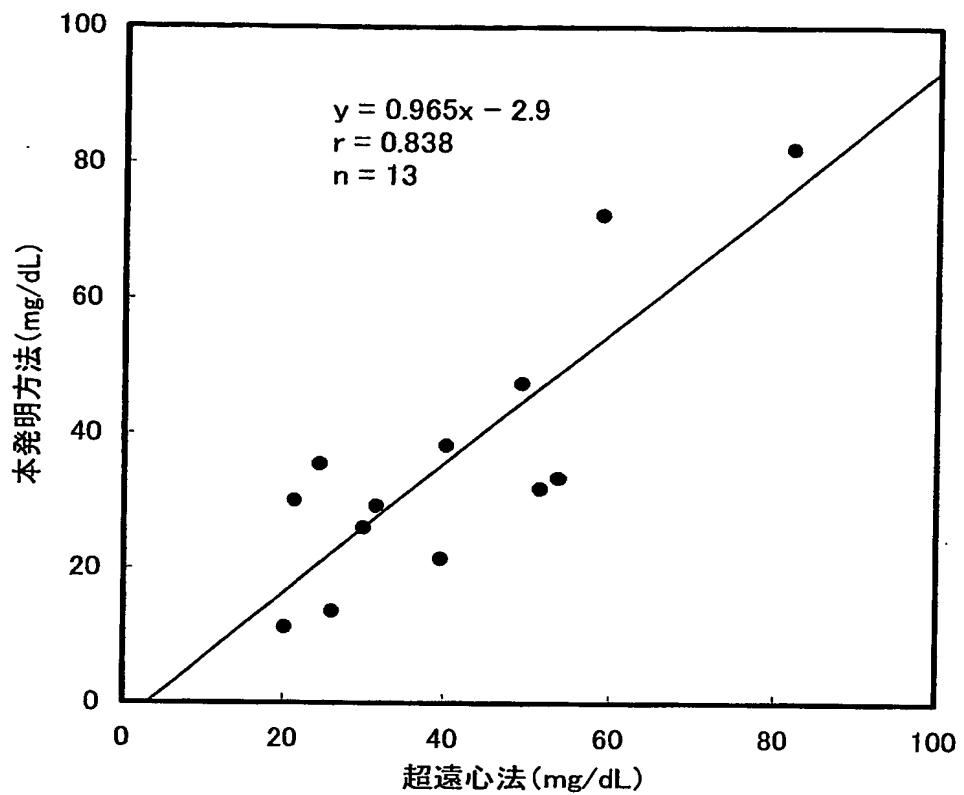


図 6

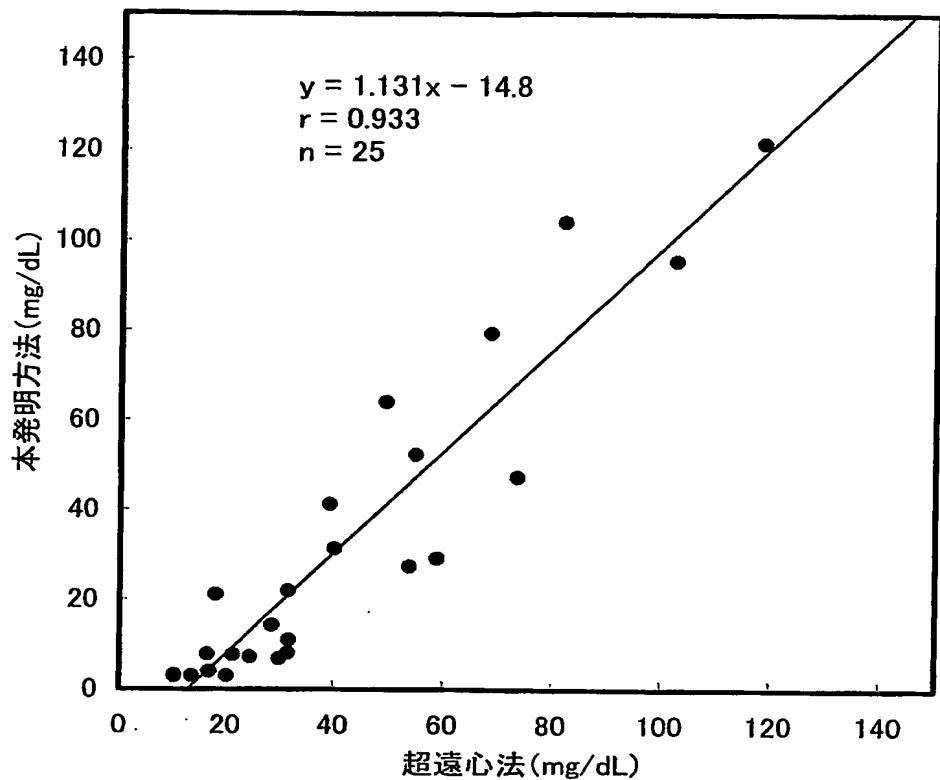


図 7

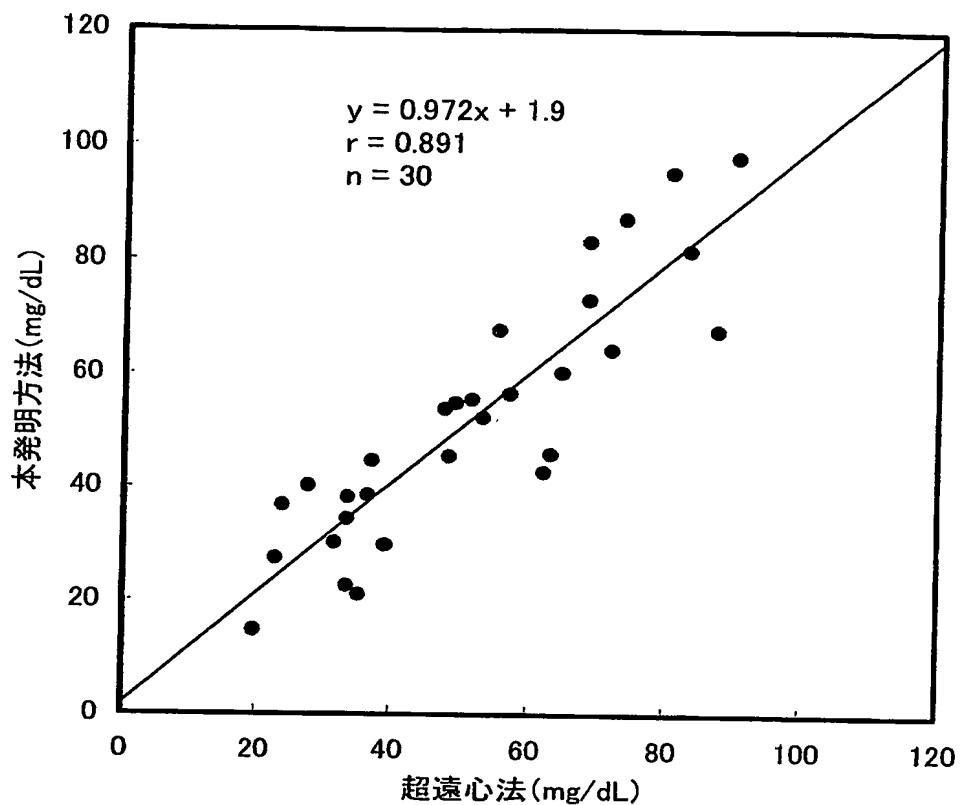


図 8

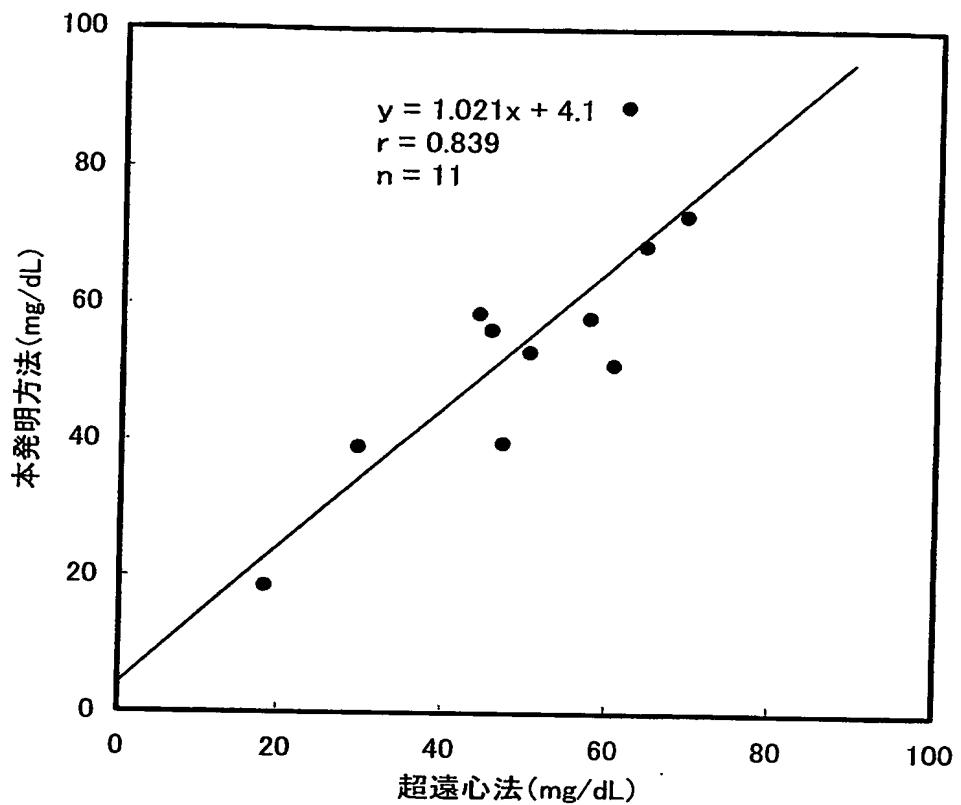


図 9

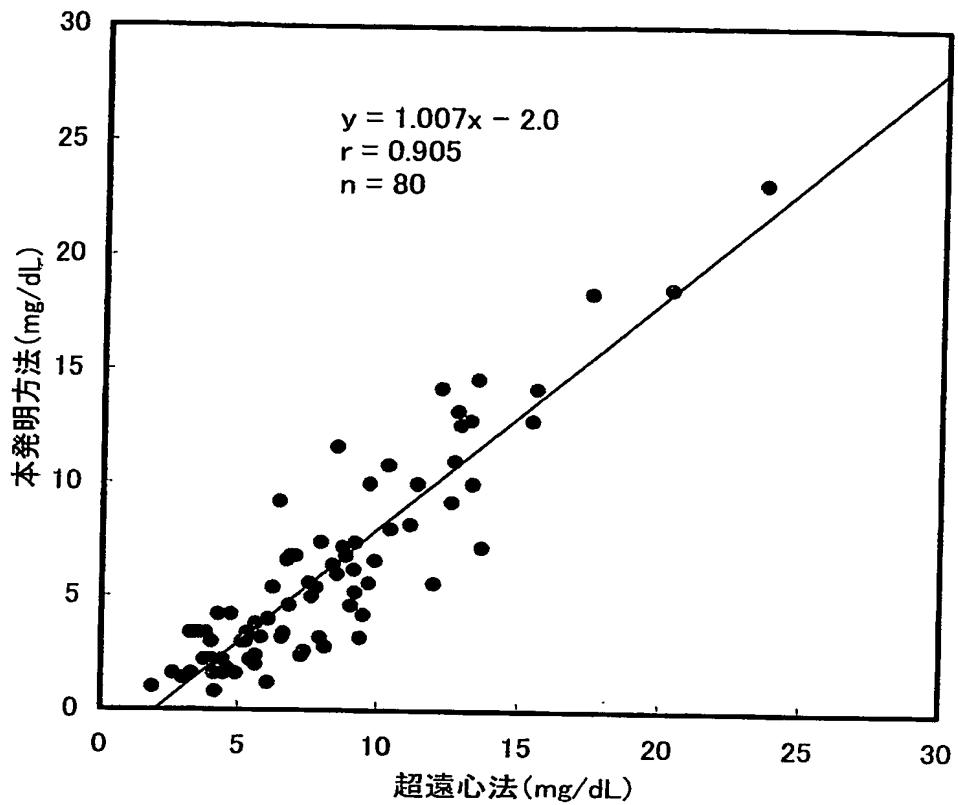
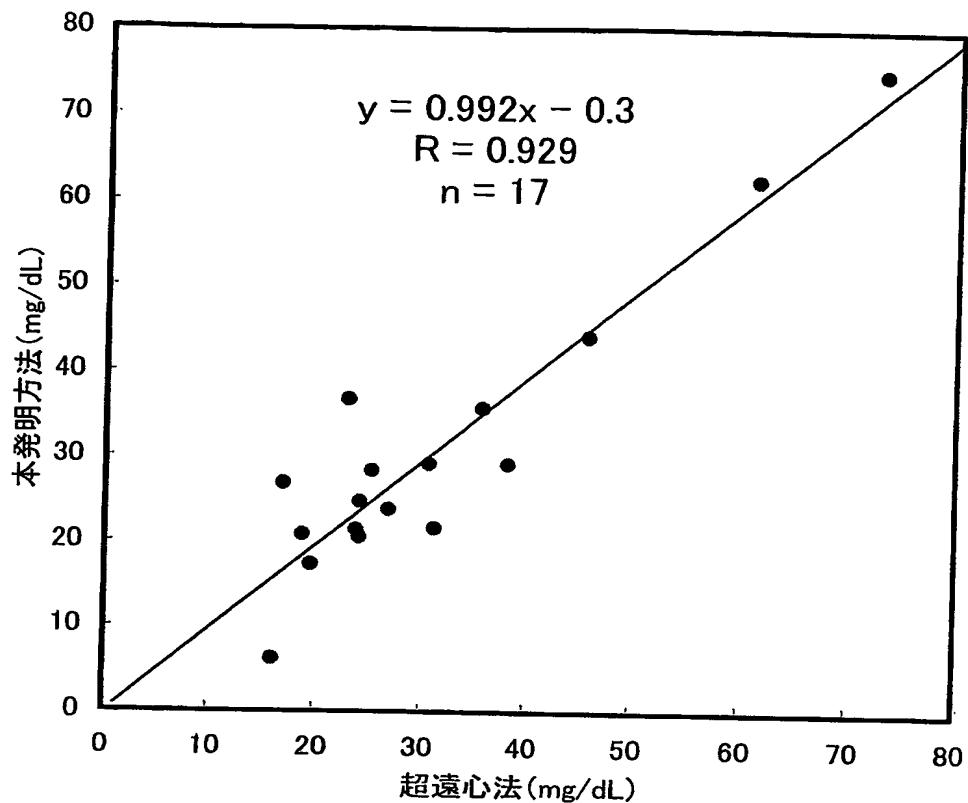


図 1 O



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	JP 2003-28882 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 29 January, 2003 (29.01.03), (Family: none)	1-29
X A	ATHEROSCLEROSIS, VOL.106, (1994), p241-253	1 2-29
A	JP 7-294532 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 10 November, 1995 (10.11.95), (Family: none)	1-29
A	JP 2000-356641 A (Helena Laboratories Co., Ltd.), 26 December, 2000 (26.12.00), & EP 1045247 A	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2004 (25.02.04)

Date of mailing of the international search report
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/15633

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/92

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/92

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P Y	JP 2003-28882 A (荏原化学株式会社) 2003. 01. 29 (ファミリーなし)	1-29
X A	ATHEROSCLEROSIS, VOL. 106, (1994), p241-253	1 2-29
A	JP 7-294532 A (荏原化学株式会社) 1995. 11. 10 (ファミリーなし)	1-29

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 02. 04

国際調査報告の発送日

09. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2 J 9015

(印)

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-356641 A (株式会社ヘナ研究所) 2000. 12. 26 & EP 1045247 A	1-29